



DEGRADACIÓN DEL ACEITE LUBRICANTE POR *Pseudomonas aeruginosa*




DEGRADATION OF LUBRICATING OIL BY *Pseudomonas aeruginosa*

Carmen Esther del Rosario Lora-Cahuas^{1*}; Nélide Milly Esther Otiniano-García²; Heber Max Robles-Castillo¹

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

² Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología. Universidad César Vallejo. Av. Larco #1770. Trujillo. Perú.

Carmen E. Lora-Cahuas:
Nélide M. Otiniano-García:
Heber M. Robles-Castillo:

 <https://orcid.org/0000-0002-4296-2641>
 <https://orcid.org/0000-0001-9838-4847>
 <https://orcid.org/0000-0003-2967-7595>

Artículo original breve

Recibido: 29 de agosto 2021

Aceptado: 28 de noviembre 2021

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la degradación del aceite lubricante por *Pseudomonas aeruginosa*. En primer lugar, el cultivo fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Universidad Nacional de Trujillo, se realizó la reactivación y verificación de la pureza del cultivo, luego se procedió a la evaluación cualitativa de la capacidad de degradación de la bacteria utilizando la metodología de Hanson. En segundo lugar, se utilizaron biorreactores modelo tanque aireado y agitado con lubricante SAE-20W50 al 1% y concentración del inóculo bacteriano al 15%. La degradación del aceite lubricante se evaluó de manera indirecta mediante la determinación del crecimiento de la bacteria en el Medio Mínimo de Davies (MMD) más el lubricante, mediante la técnica de recuento en placa cada 48 h por 6 días. Se calculó la velocidad de crecimiento, la DBO₅ por la técnica de Winkler modificada por Alsterberg y el porcentaje de aceites y grasas por la técnica de Soxhlet. Así mismo, fue determinado la eficiencia de la biodegradación, mediante la fórmula de Calvin. En la prueba cualitativa, se observó que *P. aeruginosa* realizó la degradación del lubricante a partir de las 48 horas. En cuanto al crecimiento de la bacteria, se observó que alcanza la fase logarítmica a las 96 horas con una velocidad de crecimiento de 0,0619 h⁻¹. La evaluación a las 144 h del biorreactor a temperatura ambiente (22±3 °C), se observó que la DBO₅ disminuyó desde 582,42 a 62,563 mgO₂/L; los aceites y grasas disminuyeron de 1 a 0,56%, siendo la eficiencia de degradación del aceite lubricante 44%. Se concluye que *P. aeruginosa* con inóculo al 15% presenta capacidad de degradación del aceite lubricante SAE-20W50.

Palabras clave: Aceite lubricante, degradación, inóculo, *P. aeruginosa*.

Abstract

The present work aimed to determine the degradation of lubricating oil by *Pseudomonas aeruginosa*. In the first place, the culture was provided by the Biotechnology and Genetic Engineering Laboratory of the National University of Trujillo, the reactivation and verification of the purity of the culture was carried out, then a qualitative evaluation of the degradation capacity of the bacteria was carried out using Hanson's methodology. Secondly, aerated and agitated tank model bioreactors with 1% SAE-20W50 lubricant and 15% bacterial inoculum concentration were used. The degradation of the lubricating oil was indirectly evaluated by determining the growth of the bacteria in Davies' Minimum Medium (MMD) plus the lubricant, using the plate count technique every 48 h for 6 days. The growth rate, the BOD₅ were calculated by the Winkler technique modified by Alsterberg and the percentage of oils and fats by the Soxhlet technique. Likewise, the efficiency of biodegradation was determined, using the Calvin formula. In the qualitative test, it was observed that *P. aeruginosa* carried out the degradation of the lubricant after 48 hours. Regarding the growth of the bacteria, it was observed that it reaches the logarithmic phase at 96 hours with a growth rate of 0.0619 h⁻¹. The 144 h evaluation of the bioreactor at room temperature (22±3 °C), it was observed that the BOD₅ decreased from 582.42 to 62.563 mgO₂/L; oils and greases decreased from 1 to 0.56%, the degradation efficiency of lubricating oil being 44%. It is concluded that *P. aeruginosa* with inoculum at 15% shows the degradation capacity of the lubricating oil SAE-20W50.

Keywords: Degradation, inoculum, lubricating oil, *P. aeruginosa*.

* Autor para correspondencia: clora@unitru.edu.pe

DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/rebiol.2021.41.02.07>

Citar como:

Lora-Cahuas, C., Otiniano-García, N., & Robles-Castillo, H. 2021. Degradación del aceite lubricante por *Pseudomonas aeruginosa*. REBIOL, 41(2):213-220.



1. Introducción

En la actualidad el mal manejo de los lubricantes está ocasionando la contaminación del suelo, lo que está originando un gran problema ambiental. Dentro de las actividades más frecuentes se encuentra los derrames en los talleres mecánicos automotrices los cuales generan residuos que producen contaminación tanto del suelo como del agua (Semarnat, 2005; Quiliche & Huayna, 2015). A nivel mundial el uso de aceites lubricantes alcanza los 40 millones de toneladas anuales y de esos el 60% corresponden al aceite lubricante usado. Por lo tanto, son los residuos contaminantes más abundantes (Depuroil, 2005; Cabrera, 2018).

Los componentes básicos de un aceite lubricante son: la base, compuestos por una mezcla de hidrocarburos orgánicos (TPH), bifenilos policlorados, aromáticos policíclicos y aditivos tales como metales, que ocasionan daño en el medioambiente y en la salud de los humanos. Por lo mencionado esta sustancia tiene efectos tóxicos, venenosos y cancerígenos por lo que la reglamentación establecida en el Convenio de Basilea la considera como sustancia de difícil biodegradación catalogándolo como residuo peligroso (Vásquez et al., 2010)

En nuestro país el Decreto Supremo N° 037-2008-PCM 037 aprueba la reglamentación de las Actividades de Hidrocarburos para la Protección Ambiental, en el cual incluye al aceite automotriz usado, como residuo peligroso. El límite máximo permisible de TPH aceites y grasas es de 20 mg/L (El Peruano, 2008). Por lo tanto, si excede a esta concentración va a provocar daño en el ambiente y la salud humana, originando alteraciones en donde es vertido o derramado. Cuando este lubricante se expone a la luz solar y al aire puede producir grandes cantidades de compuestos tóxicos, como Pb, Zn y Cr (Daud et al., 2016). Si se esparce en el suelo puede difundirse rápidamente, lo que produce una formación de una película que no permite el ingreso de oxígeno dando lugar a suelos infértiles o pocos productivos. Si se vierte un litro de aceite al agua se contaminarán 1 000 000 litros de la misma (Manzanares & Ibarra-Ceceña, 2012).

Una de las tecnologías limpias para tratar ambientes contaminados con aceites lubricantes es la biorremediación, la cual busca resolver los problemas de contaminación utilizando los microorganismos, como

bacterias que puedan degradar con facilidad una gran variedad de compuestos tales como el petróleo y sus derivados (Conesa et al., 2002; Pérez et al., 2015).

P. aeruginosa es una bacteria Gram-negativa que pertenece a las proteobacterias, su aislamiento es de aguas contaminadas, muestras de suelo, plantas y animales; así como, de muestras clínicas de diverso origen. Para desarrollarse, puede utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos, lo que le facilita la colonización de diversos lugares en donde otras bacterias no crecerían. Soberón (2010) realizó estudios donde logró aislar *P. aeruginosa* en sustancias tales como combustible de avión, jabón y solución de clorhexidina.

En muchos estudios se ha demostrado que esta bacteria tiene también la capacidad de degradar hidrocarburos y sus derivados en parte, se debe a que, en presencia de sustancias de naturaleza oleosa, produce biosurfactantes conocidos como ramnolípidos, que pertenecen al grupo de glicolípidos, importantes debido a su baja tensión superficial, alta capacidad emulsionante, así como su gran afinidad por moléculas orgánicas hidrófobas (Soberón, 2010; Fracchia et al., 2012; Patowary et al., 2017; Xu et al., 2020).

Bhasheer et al. (2014), utilizando la técnica de Hanson, evaluó la actividad degradativa por detección rápida y sencilla para microorganismos con potencial de degradación de petróleo crudo, esta prueba se sustenta en la habilidad de algunos microorganismos para emplear el lubricante como única fuente de carbono el cual indicará cambio de color del Diclorofenolindofenol (indicador de oxidorreducción) de color azul a incoloro)

En México, Manzanares & Ibarra-Ceceña (2012) hicieron un estudio acerca del destino final del empleo y manejo de residuos de aceite automotriz, concluyendo que la falta de buenas prácticas y el empirismo que realizan en el cambio de aceite causan daño al ecosistema.

Galindo & Llontop (2015) investigaron a *Pseudomonas* obtenidas de suelo contaminado con petróleo, determinando que eran capaces de emplear el petróleo como fuente de carbono y energía, lo que demostró su capacidad de descomposición de este compuesto.

Quiliche & Huayna (2015), aislaron e identificaron a *Pseudomonas aeruginosa* que provenían de suelos de talleres automotrices con gran potencial biorremediador.

En Ecuador, Cevallos & García (2018) valoraron la degradación de suelos con hidrocarburos usando *A. niger*, *P. ostreatus* y *P. aeruginosa* obteniéndose biodegradación del 19%, 10%, y 42% respectivamente y cuando se utilizaron los tres microorganismos se obtuvo el 44% degradación. Chirre et al. (2019), realizaron un trabajo en Lima (Perú) acerca de la degradación de aceite lubricante automotriz incrustado en arcilla, con una mezcla bacteriana compuesto por *Pseudomonas montielli*, *Rhodococcus pyridinivorans* y *Bacillus sp.* Se obtuvo 50% de biodegradación del aceite lubricante usado (hidrocarburos totales-TPH) a los 59 días, en comparación a la realizada a los 13 días, en el que se obtuvo menos del 2% Mendoza-Avalos & Guerrero-Padilla (2015) evaluaron la capacidad de biodegradación del petróleo Diesel 2 por *P. aeruginosa* en agua de mar (período 5 días) encontrándose que mientras ocurría el proceso de biodegradación de petróleo Diesel disminuía el consumo de oxígeno con respecto a las concentraciones de petróleo Diesel 2 y DBO₅.

La presente investigación tuvo como objetivo general determinar la degradación del lubricante por *P. aeruginosa* con inóculo al 15%; así como, determinar la eficiencia de degradación.

2. Materiales y métodos

El estudio se hizo con un diseño tipo experimental de una sola casilla de antes y después (problema) incluyendo un testigo (sin estímulo). Como material biológico, se empleó un cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética. Facultad de CCBB. Universidad Nacional de Trujillo.

Como material no biológico se empleó aceite lubricante marca Shell HELIX HX5 SAE 20W50 G de origen mineral.

Reactivación de *Pseudomonas aeruginosa*

El cultivo de *P. aeruginosa* se reactivó sembrando en tubos 16x150 mm con caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubando a 37 °C en estufa Memmert, durante 24 h. Luego se realizó coloración Gram y observación microscópica para comprobar la pureza del cultivo.

Evaluación cualitativa de la degradación del aceite lubricante SAE 20W50

La microdilución se realizó utilizando la técnica de Hanson (usado por Mendoza-Avalos & Guerrero-Padilla, 2015), colocando: 500 uL de medio Bushnell-Haas en tubos de 13x100 mm, 50 uL de inóculo de *P. aeruginosa* ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), 20 uL aceite lubricante al 2% y 10 uL de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) como indicador de óxido reducción. El set de tubos se incubó a 30°C, en la incubadora por 24 horas (tres repeticiones). Luego, se procedió a evaluar la capacidad degradativa a través de la observación del cambio de color en los tubos donde la bacteria actuó sobre el aceite lubricante. El indicador 2,6-DCPIP demuestra la capacidad degradativa de *P. aeruginosa* al emplear los hidrocarburos del lubricante como sustrato por medio del cambio de color de forma oxidada (azul) a forma reducida (incolora) (Afuwale & Modi, 2012; Bhasheer et al., 2014).

Diseño y acondicionamiento de biorreactores

Los biorreactores fueron construidos teniendo en cuenta las dimensiones establecidas por Brauer (1985) y Doran (1998). Se consideró el modelo Tanque Cilíndrico Aireado y Agitado (TCAA) con 0,5 L volumen de trabajo (1 VVM de aireación) y 1,0 L de volumen total. La velocidad de 480 rpm (usando motores de 5 V) permitió un Número de Reynolds (N_{RE}) igual a $2,1 \times 10^4$, de flujo turbulento (mezclado homogéneo) a temperatura ambiente (22 ± 3 °C). Los 2 biorreactores se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1,0%. Un biorreactor se utilizó como sistema testigo (sin inóculo) y el otro biorreactor como sistema experimental Problema (con inóculo al 15%).

Preparación de los materiales para determinar la capacidad de degradación por *Pseudomonas aeruginosa* con inóculo al 15% sobre el aceite lubricante SAE 20W50.

Se sembró el cultivo puro de *P. aeruginosa* en tubos con Agar Soya Trypticase (TSA), luego de 24 h, se estandarizó el inóculo, a partir del tubo N° 1 de Mac Farland (3×10^8 cel/mL) y con diluciones seriadas se obtuvo la concentración final de 3×10^6 cel/mL. A partir de esta dilución, se tomaron 75 mL (inóculo al 15%), el aceite lubricante al 1%, y fueron agregados al biorreactor problema con un volumen final

del medio Mínimo de Davis (MMD) de 0,5 L. Al biorreactor testigo solo se agregó el aceite lubricante al 1%. Se preparó Agar para Recuento en Placa (PCA), tubos de 16 x 150 mm con 9,0 mL de SSF para hacer las diferentes diluciones que se emplearon en el recuento UFC/mL, método por incorporación (Niño-Camacho & Torres-Sáenz, 2010). Se prepararon todos los materiales para la determinación del DBO₅ por la técnica de Winkler modificado por Alsterberg. (Navarro, 2007; IDEAM, 2007); y para la determinación de grasas por el método Soxhlet. (EPA, 1996; APHA, 2017).

Control y Monitoreo del proceso de degradación biológica

La biodegradación del aceite lubricante por *P. aeruginosa*, al 15% fue evaluado mediante: 1) Recuento de aerobios mesófilos viables a las 0, 48, 96 y 144 h como una medida indirecta de la degradación del aceite lubricante. 2) Demanda Bioquímica de Oxígeno, técnica de Winkler Modif-Alsterberg (IDEAM, 2007; Navarro, 2007) para determinar el consumo de oxígeno que en este caso *P. aeruginosa*, necesita para degradar las sustancias en la muestra (lubricante). Se realizó a las 0 y 144 h. 3) Determinación de aceites y grasas por el método Soxhlet (EPA, 1996; APHA, 2017) en el cual se va a determinar el contenido de aceites y grasas del lubricante cuyo resultado se encontrará al evaluar la concentración inicial y final de la extracción a las 0 y 144 h. El cálculo de la eficiencia de la biodegradación se realizó con la fórmula de Calvin, utilizado por Jáuregui & Robles (2017).

$$Efic. Biodeg. = \frac{\text{Conc. aceite inicial} - \text{Conc. aceite final}}{\text{Conc. aceite inicial}} \times 100$$

3. Resultados

Tabla 1. Evaluación cualitativa de la degradación del aceite lubricante SAE 20W50 por *P. aeruginosa*, según el método de Hanson utilizado por Mendoza-Avalos & Guerrero-Padilla (2015).

Lectura de la Microdilución		
Tiempo (h)	cambio de color	
0	(-)	(-)
24	(+)	(+)
48	(++)	(++)
Incoloro	(+)	
Azul	(-)	

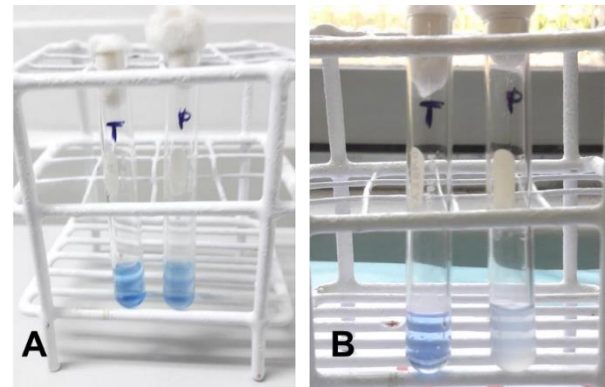


Figura 1. Degradación cualitativa del aceite lubricante SAE 20W50 por *P. aeruginosa* (A: 0 h y B: 48 h) utilizando el indicador 2,6-diclorofenolindofenol (2,6-DCPIP). Sin degradación (negativo -, azul) y con degradación (positivo +, incoloro). T = Testigo (sin inóculo) y P = Problema (con inóculo).

Tabla 2: Recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de *P. aeruginosa* con inóculo al 15 % en la degradación del lubricante SAE 20W50.).

Tiempo (h)	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas Viables (UFC/mL)
0	$5,3 \times 10^7$
24	$3,9 \times 10^{10}$
96	$7,0 \times 10^{11}$
144	$4,1 \times 10^{11}$

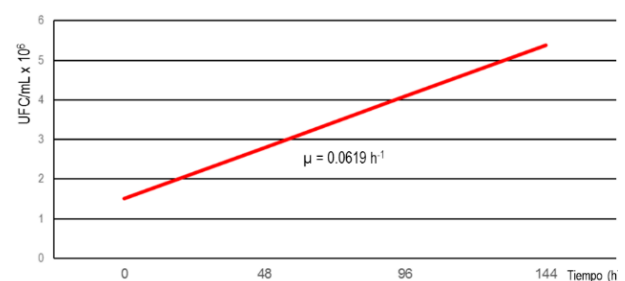


Figura 2: Tasa de crecimiento (μ) de *P. aeruginosa* en aceite lubricante SAE-20W50 en un biorreactor cilíndrico aireado y agitado de 0,5 L.

Tabla 3. Determinación del Oxígeno disuelto en el biorreactor usando a *P. aeruginosa* con inóculo al 15 % en la degradación del lubricante SAE 20W50.

Muestra	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)			
	0 h		144 h	
Tiempo (días)	0	5	0	5
Testigo	0,84	0,40	6,84	0,81
Problema	0,84	0,81	7,25	1,20

Tabla 4: Determinación del DBO₅ en el biorreactor usando a *P. aeruginosa* al 15 % en la degradación del aceite lubricante SAE 20W50.

Tiempo (h)	DBO ₅ (mg O ₂ /L)	
	0	144
Testigo	624,03	582,42
Problema	624,03	62,56



Figura 3. Biorreactor control (transparente) e inoculado (verde) con *P. aeruginosa* al 15 % en la degradación del lubricante SAE 20W50 a las 144 h.

Tabla 5: Degradación del aceite lubricante SAE 20W50 por *P. aeruginosa* a las 144 h en Medio Mínimo de Davies (determinación de aceites y grasas por el Método Soxhlet).

Tiempo (h)	% Aceites y Grasas (v/v)	
	0	144
Testigo	1,00	1,00
Problema	1,00	0,56

Tabla 6. Eficiencia degradación del aceite lubricante SAE 20W50 en un biorreactor con inóculo del 15% de *P. aeruginosa* (Problema) y en otro biorreactor sin inóculo (Testigo) a las 144 h de incubación.

	Concentración de aceites (% v/v)		Eficiencia de degradación (%)
	Inicial	Final	
Testigo	1,00	1,00	0.00
Problema	1,00	0,56	44.00

4. Discusión

Los resultados mostraron que *P. aeruginosa* utilizó el sustrato de hidrocarburos (lubricante) cuando se suministraron como única fuente carbonada y energética, que indica que pudo degradar y consumir el aceite para su crecimiento y desarrollo, observado por la turbidez y el cambio de color (Figura 1).

Para determinar la evaluación cualitativa degradativa se realizó mediante la prueba desarrollada por Hanson, utilizado por Mendoza-Avalos & Guerrero-Padilla (2015) la cual se sustenta en la capacidad de algunos microorganismos para emplear el lubricante (petróleo) como única fuente de carbono el cual indicará cambio de color del Diclorofenolindofenol (indicador de oxidorreducción) de color azul a incoloro (Bhasheer et al., 2014).

Durante el proceso de oxidación de hidrocarburos por los microorganismos, el oxígeno, los nitratos y sulfato, actúan como aceptores de electrones. Al incorporar como aceptor de electrones el DCPIP, se puede determinar la capacidad del microorganismo para utilizar los hidrocarburos como sustratos observando el cambio de color de DCPIP oxidado (azul) ha reducido (incoloro) (Mendoza-Avalos y Guerrero-Padilla, 2015).

El medio empleado fue Bushnell-Haas brinda todos los nutrientes que necesita el microorganismo para su crecimiento y producción de biosurfactantes, tales como el magnesio, hierro, K₂HPO₄, KH₂PO₄ y el NH₄NO₃ (utiliza los nitratos como aceptor final de electrones) (Holmboe et al., 2001).

En relación al crecimiento de *P. aeruginosa* al 15%, se suplementó el medio de cultivo con 1% de aceite lubricante como única fuente de carbono, en esta prueba, se pudo corroborar que al utilizar el lubricante como fuente carbonada esta bacteria presenta fases de desarrollo en donde la fase log, es la más remarcada e importante, ya que es en esta fase es donde ocurre la degradación de compuestos.

Se observó que la fase logarítmica de crecimiento ocurre a las 96 h con una velocidad de crecimiento de $0,0619 \text{ h}^{-1}$ y a las 144 h el número de UFC/mL empieza a ser constante (Tabla 2 y Figura 2).

Para poder degradar el aceite, *P. aeruginosa* produce sustancias surfactantes que van a ayudar en el proceso de degradación del lubricante SAE-20W50 (Hidrocarburo). Esto se ha demostrado en diversos estudios, que indican que algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Rhodococcus*, y *Corynebacterium*, producen biosurfactantes que actúan de manera eficiente en la degradación de petróleo crudo. La molécula del biosurfactante tiende a reducir la tensión de la superficie e interface entre sólidos, líquidos y gases. Forma micelas alrededor del hidrocarburo, lo que produce un incremento de la superficie del sustrato hidrocarbonado facilitando su emulsificación y así mejora la disponibilidad a través de la solubilización en agua (Abbasian et al., 2016; Parthipan et al., 2017; Patowary et al., 2017). Así, en su trabajo Varjani & Upasani (2017) plantearon que *P. aeruginosa* DS 10-129 produce un tipo de biosurfante ramnolípido en lugares contaminados con gasolina y diésel. De otro lado Kaskatepe & Yildiz (2016) encuentran en sus trabajos que estos ramnolípidos tienen un gran potencial, para la remediación de suelos contaminados debido a su biodegradabilidad y baja toxicidad.

Mondragón (2011) determinó que esta bacteria empieza su fase log a las 4 horas y termina a las 24 horas. En nuestro trabajo, las condiciones no fueron las mismas que las reportadas; sin embargo, nuestros hallazgos revelan que la fase logarítmica se mantiene desde las 48 h, aumentando de 10^7 a 10^{10} UFC/mL. De otro lado, Varjani et al. (2015), en un estudio con *P. aeruginosa* donde utiliza alcanos como fuente principal de carbono y metabólicamente demora 5 horas para poder adaptarse de las condiciones desfavorables. En el caso nuestro evaluamos el crecimiento

de *P. aeruginosa* utilizando como fuente de carbono el aceite lubricante SAE 20W50, desarrollándose favorablemente y manifestando la degradación del mismo. Vilasó et al. (2016), determinaron que cuando esta bacteria se encuentra a temperaturas entre 15°C a 50°C , su capacidad de biodegradación del petróleo se debe la producción de biosurfactantes ya que estos disminuyen la tensión interfacial cuando el hidrocarburo este mezclado con agua. De otro lado, Molano & Flórez (2016) confirmaron que *P. aeruginosa* tiene un óptimo crecimiento y excelente adaptación al sustrato comparada con otros microorganismos, por lo tanto, es una buena candidata para procesos de biodegradación de hidrocarburos. En el caso nuestro también se pudo observar la degradación de aceite lubricante SAE 20W50. Durante el experimento se observó el crecimiento de la bacteria de 10^7 hasta 10^{11} UFC/mL, lo que indirectamente implica degradación del lubricante compuesto de hidrocarburos debido a la producción de ramnolípidos, lo que se evidenció de un color crema en la superficie del biorreactor y en todo el líquido se observó un color verdoso se debe a los pigmentos que *P. aeruginosa* produce a partir de una fuente de carbono, en este caso, el aceite lubricante SAE-20W50.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5), fue utilizado como indicador de degradación de materia orgánica en forma indirecta. Según los resultados obtenidos, se aprecia una clara disminución del DBO_5 en el biorreactor Problema ($62,56 \text{ mgO}_2/\text{L}$) con respecto al biorreactor Control ($582,42 \text{ mgO}_2/\text{L}$), por lo que se puede inferir que *P. aeruginosa* ha degradado al aceite lubricante (Tabla 4). Pues como se sabe, la DBO_5 viene a ser la cantidad de oxígeno disuelto (mgO_2/L) que se requieren para degradar materia orgánica de una muestra por la acción bioquímica aeróbica de microorganismos en condiciones determinadas por 5 días a 20°C (Navarro, 2007).

Este resultado es similar a los reportados en otras investigaciones que emplearon la DBO_5 para indicar de manera indirecta la degradación de compuestos orgánicos, tal es el caso de Mendoza-Avalos & Guerrero-Padilla (2015), en el que encontraron que al degradar el petróleo Diesel-2 hubo una disminución del DBO_5 en agua de mar. Así mismo, Jáuregui & Robles (2017) reportaron que, utilizando otra sustancia, como la vinaza, hubo disminución del DBO_5 de 270 a $129 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un consorcio

bacteriano, lo que significa que las sustancias biodegradables (nitratos) contenidas en este sustrato han sido degradadas.

La utilización del método de Soxhlet para determinar la grasa total en los biorreactores, permitió observar la disminución porcentual de la grasa del lubricante, lo que indica que la bacteria ha degradado a este compuesto (Tabla 5). Por lo tanto, se puede asumir que el crecimiento bacteriano, el DBO_5 y las grasas totales, son indicadores indirectos de la degradación del lubricante SAE-20W50 obteniéndose una eficiencia de biodegradación a los 6 días del 44%. (Tabla 6) Comparado con González et al. (2019), ellos encontraron un 50% de remoción de aceites en aguas residuales de lava autos-lubricadores cuando se agregó un consorcio bacteriano conformadas por *Mycobacterium* sp. *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas* sp.

5. Conclusiones

Se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* en inóculo al 15%, degrada el aceite lubricante SAE 20W50 a las 144 horas.

Se demostró cualitativamente la capacidad de degradación de aceite lubricante SAE-20W50 por *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa desarrolla bien en medio de cultivo con aceite lubricante al 1%, alcanzando la fase logarítmica a las 96 horas, con una velocidad de crecimiento de $0,0619 \text{ h}^{-1}$.

La DBO_5 disminuye durante el tratamiento de aceite lubricante SAE 20W50 con *Pseudomonas aeruginosa*, observándose una variación de 582,42 a 62,56 mgO_2/L a las 144 horas. Se observó disminución de aceites y grasas por el método de Soxhlet del 1% a 0,56% en 144 horas.

La eficiencia de degradación de aceite lubricante SAE-20W50 por *Pseudomonas aeruginosa* fue de 44%.

6. Contribución de los autores

C. E. Lora-Cahuas: Concepción de la idea, interpretación de datos y aprobación final de informe

N. M. E Otiniano-García: Concepción de la idea, interpretación de datos y aprobación final de informe

H. M. Robles-Castillo: Recolección y procesamiento de datos.

7. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

7. Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú; por el apoyo logístico y de ambientes brindados, posibilitando de esta manera la realización de la presente investigación.

8. Referencias Bibliográficas

- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 178, 224e250.
- Afuwale, C., & Modi, H. (2012). Study of bacterial diversity of crude oil degrading bacteria isolated from crude oil contaminated sites. *Life sciences léanles*, 6, 13-23.
- American Public Health Association (APHA). (2017). "5520-D Aceite y grasa", Métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales. <https://www.standardmethods.org/doi/abs/10.2105/SMWW.2882>.
- Bhasheer, S., Umavathi, S., Banupriya, D., Thangavel, M., & Thangam, Y. (2014). Diversity of diesel degrading bacteria from a hydrocarbon contaminated soil. *App. Sci*, 3(11), 363-369.
- Brauer, H. (1985). Stirred Vessel Reactors. In: *Biotechnology Vol 2. Fundamentals of Biochemical Engineering*. Edited by J. Rehm and G. Reed. Deutsche Bibliothek cataloguing.
- Cabrera, J. (2018). Elaboración de un diagnóstico de la gestión de aceites automotrices usados generados en lubricadoras y estaciones de servicio para el planteamiento de una propuesta de manejo adecuado ciudad de Quedo, provincia de los Rios-2016. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Tumbes, Perú].
- Cevallos, P., & García, D. (2018). Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Aspergillus niger*, *Pleorotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis para título, Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador].
- Chirre, J., Patiño, A., & Erazo, E. (2019). Estudio de la biodegradación de residuos de aceite lubricante retenidos en bentonita usando el consorcio bacteriano oil eating microbes (*Rhodococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*). *Rev Soc Quím Perú*, 85(2), 163-174.
- Conesa, A., Punt, P., Van, D., & Hondel, C. (2002) Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications. *J. Biotechnol*, 193,143-158.
- Daud, S., Najib, M., & Zahed, N. (2016). Classification of lubricant oil odor-profile using casebased reasoning. *Process and Control (ICSPC)*, 207-2012).
- Depuroil, S. A. (2005). Riesgos medioambientales de los aceites industriales. <http://www.euskalnet.net/depuroilsa/Divulgacion.html>
- Doran, P M. (1998). Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. Edit. Acribia. Zaragoza. España.
- El Peruano NT. 2008. Ley 28611 DS N°037-2008-PCM y DS N° 015-2006-EM. Perú.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Martinotti, M., & Banat, I. (2012). Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials. <https://www.intechopen.com/chapters/26371>

- Galindo, M., & Llontop, J. (2015). Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura. [Tesis título, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú].
- González, J., Heredia, D., & Rodríguez, R. (2019). Biorremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivo mixto de microorganismos: caso Lubricadora Puyango. Enfoque UTE, 10, 185-196.
- Holmboe, N., Kristensen, E. & Andersen, F. (2001). Anoxic decomposition in sediments from a tropical mangrove forest and the temperate wadden sea: implications of N and P additions. Estuar. Cost. Shelf, 53, 125-140.
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). (2007). Determinación de Oxígeno Disuelto método Yodométrico modificación de Azida. <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Ox%C3%ADgeno+Disuelto+M%C3%A9todo+Winkler.pdf/e2c95674-b399-4f85-b19e-a3a19b801dbf>
- Jáuregui, S., & Robles, H. (2017). Efecto de la concentración de inóculo de un consorcio bacteriano nativo en la degradación de los nitratos de vinaza de una destilería de alcohol. Agroind. Sci, 7(2), 57-66.
- Kaskatepe, B., & Yildiz, S. (2016). Rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas* species. Braz. Arch. Biol. Technol, 59, e16160786.
- Manzanares, L., & Ibarra-Ceceña, M. (2012). Diagnóstico del uso y manejo de los residuos de aceite automotriz en el Municipio del Fuerte. Univ. Autónoma Indígena de México. Sinaloa Ra Ximhai, 8(2), 129-137.
- Mendoza-Avalos, A., & Guerrero-Padilla, A. (2015). Biodegradación de petróleo diesel-2 en agua de mar por *Pseudomonas aeruginosa* en un biorreactor aireado y agitado. Revista SCIENDO, 18(1), 23-37.
- Molano, J., & Flórez, M. (2016). Prueba piloto para la determinación de la tolerabilidad del carbofurano usando *Pseudomonas* sp. proveniente del suelo. [Tesis para Título, Universidad La Salle. Bogotá, Colombia].
- Mondragón, L. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR. [Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, México].
- Navarro, M. (2007). Demanda Bioquímica de Oxígeno 5 días, incubación y electrometría. TP0087. IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales). República de Colombia.
- Niño-Camacho, L., & Torres-Sáenz, R. (2010). Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas *Pseudomonas putida* biodegradadoras de fenol. Revista ION, 23 (1), 41-46.
- Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L., Rahman, P., Murugan, K., Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. Front. Microbiol. 8, 193.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M., & Deka, S. (2017). Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. Front. Microbiol, 8, 279.
- Pérez, R., Silva, M., Peñuela, G., & Cardona, G. (2015). Evaluación de biocombustibles e hidrocarburos del petróleo (gasolina y diesel) en un suelo: proceso de transporte y biorremediación. Revista EIA, 12, 21-46.
- Quiliche, J., & Huayna, D. (2015). Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de suelos en talleres de automóviles con potencial en biorremediación. Infinitum, 5(2), 105-109.
- Semarnat. (2005). Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. Diario oficial de la federación. México. 21 p.
- Soberón, C. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*. UNAM. México. http://congresos.cio.mx/3_enc_mujer/files/orales/Extensos/Ponencia%2010.doc
- United States Environmental Protection Agency (EPA). (1996). SW-846 Method 3540C Soxhlet Extraction. Manual. Government Printing Office. <https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3540c.pdf>
- Varjani, A., & Upasani, V. (2017). Crude oil degradation by *Pseudomonas aeruginosa* BCIM 5514: Influence of process parameters. Indian Journal of Experimental Biology. 55, 493-497.
- Varjani, S., Rana, D., Jain, A., Bateja, S., & Upasani, V. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. Int. Biodeterior. Biodegradation, 103, 116-124.
- Vásquez, M., Guerrero, J., & Quintero, A. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. Revista Colombiana de Biotecnología, 12(1), 141-157.
- Vilasó, J., Rodríguez, O., & Ábalos, A. (2016). Extracción de petróleo en suelo contaminado empleando ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* ORA9. Rev. Int. Contam. Ambie, 33 (3), 485-493.
- Xu, A., Wang, D., Ding, Y., Zheng, Y., Wang, B., Wei, Q., Wang, S., Yang, L. & Ma, L. (2020). Integrated comparative genomic analysis and phenotypic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from crude oil. Front. Microbiol, 11, 519.